

**SKRINING SENYAWA ANTIBAKTERI DARI *Halymenia durvillaei* J.G.**

**Agardh. ASAL PERAIRAN PULAU LAE-LAE**

**Oleh :**

**ANDI NURUL FITRIA**

**H41101031**



**JURUSAN BIOLOGI**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

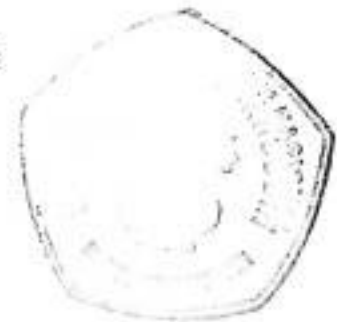
**UNIVERSITAS HASANUDDIN**

**MAKASSAR**

**2006**

**Skrining Senyawa Antibakteri dari *Halymenia durvillaei* J.G.**

**agardh. Asal Perairan Pulau Lae-lae**



*Skripsi Ini Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin*

Oleh :

Andi Nurul Fitria

H 411 01 031

UNTA	
Tgl. Pengantar	01-03-2007
Asal	Fale-MIPA
Daerah	(L. satu) dus
Nama	H
No. Induk	950/013-7.
No. K.	36719

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2006**

**Skrining Senyawa Antibakteri *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh.  
dari Perairan Pulau Lae-lae**

Disetujui Oleh:

Pembimbing Utama




**(Dra. Risco B. Gobel, MS)**  
NIP. 130 785 082

Pembimbing Pertama



**(Dra. Sartini, M.Si)**  
NIP. 131 696 792

Pembimbing Kedua



**(Drs. Robert Sutjipto, MS)**  
NIP. 130 369 541

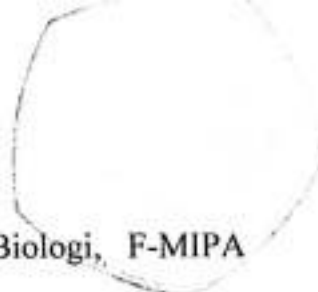
## PRAKATA

Alhamdulillah, puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas rahmat, berkah dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “ **Skrining Senyawa Antibakteri *Halymenia durvillaei* dari Perairan Pulau Lae-lae**” yang merupakan salah satu syarat untuk menyelesaikan jenjang Strata Satu (S1) pada Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

Penulisan tugas akhir ini dapat terlaksana dengan baik berkat bimbingan, dorongan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karenanya penulis dengan segala kerendahan hati ingin menyampaikan rasa terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya khususnya kepada **Ibu Dra. Risco B. Gobel, MS** selaku Pembimbing Utama, **Ibu Dra. Sartini, M.Si** selaku Pembimbing Pertama dan **Bapak Drs. Robert Sutjipto, MS** sebagai Pembimbing Kedua yang senantiasa memberikan bimbingan, petunjuk, motivasi dan arahan dalam penyusunan skripsi ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada **Ibu Dra. Elis Tambaru** selaku Penasehat Akademik yang telah membimbing dan mengarahkan penulis selama menempuh pendidikan.

Pada kesempatan ini penulis juga ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada :

- Bapak Prof. Dr. H. Alfian Noor, M.Sc. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin beserta staf.

- 
- Bapak Drs. Karunia Alie, M.Si. selaku Ketua Jurusan Biologi, F-MIPA Universitas Hasanuddin beserta staf yang telah memberikan bantuan kepada penulis selama mengikuti pendidikan.
  - Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Biologi F-MIPA Universitas Hasanuddin yang telah memberikan ilmunya selama penulis menempuh pendidikan.
  - Sahrin Sayuti, Yusuf dan Marjuni yang telah membantu dalam pengambilan sampel alga.
  - Saudara-saudariku **Biologi 2001** atas segala doa, dukungan, kebersamaan, canda tawa dalam suka dan duka di kampus merah ini yang menjadi kenangan yang tak terlupakan.
  - Irfan Ady S. yang telah memberikan dukungan, semangat dan perhatiannya.
  - Semua pihak yang tidak sempat disebutkan satu persatu.

Terhusus penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada Ayahanda Drs. Andi Lingka dan Ibunda Faradiba atas curahan kasih sayangnya, adik-adikku tersayang Andi Yusuf Hidayat dan Andi Tenri Ola serta seluruh keluarga besar yang tak pernah lelah memberikan doa yang tulus.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa penulisan tugas akhir ini masih jauh dari kesempurnaan, untuk itu dengan segala kerendahan hati penulis sangat menghargai segala saran dan kritik yang bersifat membangun guna melengkapi kekurangan tersebut.

Harapan penulis semoga skripsi ini dapat bermanfaat, sesungguhnya semua yang terwujud atas petunjuk Allah SWT semata. Mudah-mudahan Ridho-Nya senantiasa mengiringi setiap langkah dan usaha kita semua, Amin.

Makassar, Desember 2006

## ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang skrining senyawa antibakteri *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh. dari perairan pulau Lae-lae Penelitian ini meliputi penyarian dengan metode maserasi menggunakan cairan penyari methanol dan dilanjutkan dengan penyari heksan. Ekstrak dibuat dengan konsentrasi 0,1 %, 1 %, 10 % dan air suling sebagai kontrol negatif. Penelitian dan pengukuran diameter hambatan yang terbentuk dari ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh terhadap *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan metode difusi pada medium Glukosa Nutrien Agar (GNA) dengan waktu inkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu dilanjutkan dengan analisis KLT Bioautografi dengan metode bioautografi kontak. Pemisahan secara KLT – Bioautografi dengan eluen etil asetat : Metanol : air (10 :2 :1) diperoleh noda dengan nilai Rf 0,97, Rf 0,81 dan Rf 0,30 yang mengandung senyawa terpenoid dan steroid. Pemisahan secara KLT – Bioautografi dengan eluen Heksan : etil asetat (3 : 1) diperoleh noda dengan nilai Rf 0,57 dan Rf 0,97 yang mengandung senyawa steroid dan terpenoid. Semua senyawa antibakteri yang diperoleh bersifat bakteriostatik

Kata kunci : *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh, skrining, KLT-Bioautografi.

## ABSTRACT

A research about screening for chemical compound of antibacterial of *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh from Lae-lae island has been done. This research pervades an extract with maserasi method using the liquid of methanol extract and hexane. The composition of the extract liquid are 0,1 %, 1%, 10 % and using aquadest as a negative control. The research and measurement of resistance diameters which formed by the extract of *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* is done by diffusion method at Glucosa Nutrient Agar (GNA) with incubated during 24 hours at the temperature of 37 °C. after that, the process continued with TLC. Bioatugraphic analyzing with contact bioautographic method. Dissoiation by TLC-Bioautographic with eluen etil asetat : Methanol : aquadest (10 :2 :1) obtains active stain with Rf 0,97, Rf 0,81 dan Rf 0,30 contain steroid and terpenoid. Dissociation by TLC-Bioautographic with eluen Hexane : etiasetat (3 : 1) obtain active stain with Rf 0,57 and Rf 0,97 contain steroid and terpenoid. All compound of antibacterial in *Halymenia durvillaei* is bacteriostatic

Key words : *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh, screening, TLC-Bioautographic.



## DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul.....	i
Lembar Pengesahan.....	ii
Prakata.....	iii
Abstrak.....	vi
Abstract.....	vii
Daftar Isi.....	viii
Daftar Tabel.....	x
Daftar Gambar.....	xi
Daftar Lampiran.....	xii
<b>BAB I. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
I.1 Latar Belakang.....	1
I.2 Tujuan Penelitian.....	3
I.3 Waktu dan Tempat Penelitian.....	3
I.4 Manfaat Penelitian.....	3
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
II.1 Uraian Umum <i>Halymenia durvillaei</i> J.G. Agardh .....	4
II.1.1 Klasifikasi <i>Halymenia durvillaei</i> J.G. Agardh .....	4
II.1.2 Morfologi.....	4
II.1.3 Ekologi.....	5
II.1.4 Manfaat.....	6
II.2 Tinjauan Umum Mikroba Uji.....	7
II.2.1 Klasifikasi, sifat dan morfologi bakteri.....	7
II.2.2 Mekanisme Kerja Antimikroba .....	10
II.3 Ekstraksi Bahan Alam.....	11

II.4 Metode Pemisahan.....	13
II.4.1 Kromatografi Lapis Tipis.....	13
II.4.2 Rf (retardation Factor).....	15
II.4.3 Uraian Umum Bioautografi.....	16
<b>BAB III. METODOLOGI PENELITIAN.....</b>	<b>19</b>
III.1 Alat.....	19
III. Bahan.....	19
III.3 Cara Kerja.....	20
III.3.1 Penyiapan Alat dan Bahan.....	20
III.3.2 Pengambilan sampel.....	21
III.3.3 Ekstraksi.....	21
III.3.4 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak.....	22
III.3.5 Penyiapan Bakteri .....	22
III.3.6 Pengujian Ekstrak <i>Halymenia durvillaei</i> J.G. Agardh.....	23
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>26</b>
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>43</b>
V.1 Kesimpulan.....	43
V.2 Saran.....	44
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>45</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>48</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rata-rata hasil pengukuran diameter hambatan ekstrak <i>Halymenia durvillaei</i> J.G. Agardh dengan larutan penyari metanol dan heksan terhadap pertumbuhan bakteri <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i> masa inkubasi 1 x 24 jam.....	26
2. Pemisahan secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan menggunakan eluen Etil asetat : Metanol : Air (10 : 2 : 1) untuk ekstrak <i>Halymenia durvillaei</i> dengan menggunakan penyari metanol dan eluen Heksan : Etil asetat (3:1) untuk ekstrak <i>Halymenia durvillaei</i> dengan menggunakan penyari heksan.....	32
3. Hasil yang diperoleh pada KLT – Bioautografi dengan menggunakan cairan pengelusi Etil asetat : Metanol : Air (10 : 2 : 1) untuk ekstrak <i>Halymenia durvillaei</i> dengan menggunakan penyari metanol dan Heksan : Etil asetat (3 : 1) untuk ekstrak <i>Halymenia durvillaei</i> dengan menggunakan penyari heksan terhadap <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> .....	34

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Zona hambatan ekstrak <i>Halymenia durvillaei</i> J.G. Agardh dengan menggunakan penyari metanol dan heksan terhadap <i>Escherichia coli</i> .....	28
2. Zona hambatan ekstrak <i>Halymenia durvillaei</i> J.G. Agardh dengan menggunakan penyari metanol dan heksan terhadap <i>Bacillus subtilis</i> .....	29
3. Zona hambatan ekstrak <i>Halymenia durvillaei</i> J.G. Agardh dengan menggunakan penyari metanol dan heksan terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> .....	30
4. KLT ekstrak <i>Halymenia durvillaei</i> J.G. Agardh dengan penampak noda sinar UV 366 nm .....	33
5. Bioautogram dengan menggunakan eluen etil asetat : metanol : air (10 : 2 : 1) terhadap <i>Escherichia coli</i> .....	35
6. Bioautogram dengan menggunakan eluen etil asetat : metanol : air (10 : 2 : 1) terhadap <i>Bacillus subtilis</i> .....	35
7. Bioautogram dengan menggunakan eluen etil asetat : metanol : air (10 : 2 : 1) terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> .....	36
8. Bioautogram dengan menggunakan eluen heksan : etil asetat (3 : 1) terhadap <i>Escherichia coli</i> .....	36
9. Bioautogram dengan menggunakan eluen heksan : etil asetat (3 : 1) terhadap <i>Bacillus subtilis</i> .....	37
10. Bioautogram dengan menggunakan eluen heksan : etil asetat (3 : 1) terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> .....	37
11. Hasil identifikasi senyawa antibakteri ekstrak <i>Halymenia durvillaei</i> J.G. Agardh dengan menggunakan penyari heksan dengan penampak sinar UV 366 nm.....	39
12. Hasil identifikasi senyawa antibakteri ekstrak <i>Halymenia durvillaei</i> J.G. Agardh dengan menggunakan penyari metanol dengan penampak sinar UV 366 nm.....	41

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sampel <i>Halymenia durvillaei</i> J.G. Agardh.....	48
2. Komposisi medium.....	49
3. Skema kerja.....	50
4. Hasil pengukuran diameter hambatan (mm) ekstrak <i>Halymenia durvillaei</i> J.G. Agardh dengan menggunakan cairan penyari metanol dan heksan .....	51

# BAB I

## PENDAHULUAN

### I.1 Latar Belakang

Wilayah pesisir dan laut Indonesia kaya akan sumber daya alam seperti alga. Alga laut dapat tumbuh dengan baik di pantai terumbu karang (coral reef) dimana persyaratan untuk tumbuh banyak dipenuhi oleh faktor kedalaman, cahaya, substrat serta faktor fisika air. Meskipun memiliki beragam jenis alga laut, Indonesia belum banyak memanfaatkan potensi sumber daya hayati ini. Berbagai jenis alga merah dapat menghasilkan agar-agar, seperti dari marga *Gelidium*, *Gracilaria*, dan *Hypnea* merupakan bahan pokok untuk pembuatan agar-agar di Indonesia, baik oleh industri perusahaan maupun industri rumah tangga. Dalam industri farmasi dan penelitian mikrobiologi, agar-agar digunakan sebagai bahan pematat media pertumbuhan untuk mikroorganisme. Untuk kosmetika agar-agar digunakan untuk pembuatan salep, cream, sabun lotion. Agar-agar digunakan pula sebagai bahan additife dalam berbagai proses industri (Angka, 2000; Dahuri, 1996; Luning, 1990).

Pemanfaatan alga sebagai bahan pangan, misalnya ada yang dimakan mentah seperti lalap, dibuat sayur, acar, manisan, kue dan juga sebagai obat cenderung meningkat dengan makin meningkatnya penelitian kandungan kimianya. Berbagai hasil penelitian mengenai kandungan substansi aktif dalam alga dilaporkan oleh para ilmuwan. Produk alam dari alga telah banyak diidentifikasi dan diekstraksi serta diuji bioaktivitasnya. Beberapa sifat bioaktivitas alga yang telah dilaporkan antara lain

sifat antimikroba, antivirus, antihipertensi, antihypocholesterolemia dan antikanker (Atmaja, 1996).

Telah banyak penelitian-penelitian yang mengarah kepada pencarian dan penemuan antibiotika baru. Diantaranya telah berhasil ditunjukkan bahwa ekstrak *Sargassum echinocarpum* dapat bersifat antibakterial yaitu menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Pasambe M., 2004).

Pulau Lae-lae cukup kaya akan beraneka macam alga. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Darmawanti B., 2001 telah diidentifikasi jenis makroalga kelas Rhodophyceae di perairan pulau Lae-lae diantaranya *Halymenia durvillaei*.

Kandungan bahan bioaktif dari *Halymenia durvillaei* belum diketahui dengan jelas. Oleh karena itu maka telah dilakukan penelitian tentang skrining senyawa antibakteri *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh yang berasal dari perairan pulau Lae-lae dengan menggunakan cairan penyari metanol dilanjutkan dengan penyari heksan.

## **I.2 Tujuan Penelitian**

1. Mengetahui golongan senyawa bioaktif yang bersifat sebagai antibakteri dari ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh.
2. Mengetahui kemampuan senyawa antimikroba dari *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*.

## **I.3 Waktu dan Tempat penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai Oktober 2006, bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan biologi dan Laboratorium Fitokimia Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin, Makassar.

## **I.4 Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah bagi masyarakat dan peneliti, sehingga dapat membantu dalam usaha pengelolaan dan pemanfaatan *Halymenia durvillaei* di masa yang akan datang sebagai penghasil senyawa bioaktif.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### II.1 Uraian umum *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh

##### II.1.1 Klasifikasi

*Halymenia durvillaei* J.G. Agardh (Verheij, 1993) :

- Regnum : Plantae
- Divisio : Thallophyta
- Class : Rhodophyceae
- Ordo : Gigartinales
- Familia : Halymeniaceae
- Genus : *Halymenia*
- Spesies : *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh

##### II.1.2 Morfologi

*Halymenia* merupakan salah satu marga dari alga merah yang termasuk dalam famili Halymeniaceae. Melihat bentuk luarnya, alga merah tidak dapat dibedakan susunan kerangka antara akar, batang dan daun. Keseluruhan dari tumbuhan ini merupakan batang yang dikenal sebagai talus. *Halymenia* memiliki talus berbentuk pita, licin, lunak fleksibel (gelatinous), dengan cabang-cabang yang banyak. Pada talus bagian bawah biasanya melebar ukurannya dapat mencapai 2 cm dan berangsur-angsur mengecil ke bagian ujung, pinggir talus bergerigi. Ketinggian rumpun bisa mencapai tinggi 30 cm. Holdfast berbentuk cakram yang melekat langsung pada

substrat. Umumnya hidup di tempat yang lebih dalam jika dibandingkan dengan habitat alga lainnya. Berwarna merah sampai ungu, kadang-kadang juga lembayung atau pirang kemerah-merahan. Hal ini didukung oleh pigmen fotosintesis berupa fikoeritrin yang mampu mengabsorpsi cahaya gelombang pendek. Selain fikoeritrin, juga dijumpai pigmen lainnya seperti xantofil, beta-karotin dan fikosianin. Dinding sel alga merah terdiri dari selulosa dan mempunyai lapisan luar musilagenik yang terbuat dari Karagen atau agar. Dua molekul ini mempunyai nilai yang baik sebagai unsur pembuatan gel (Darmawati, 2001; Tjitrosoepomo, 1993; Bayard, 1993; Leon dan Wimey-cook; 1953)

### **II.1.3 Ekologi**

Perubahan musim dan keadaan substrat dari pulau merupakan penyebab adanya perbedaan faktor lingkungan. Macam-macam substrat dan faktor –faktor oceanografi (fisika, kimia dan dinamika) sangatlah menentukan pertumbuhan alga. Diantara faktor-faktor ekologi yang merupakan syarat-syarat dari pertumbuhan dan penyebaran alga meliputi (Trono; 1988) :

#### **a. Faktor Fisika**

- Gerakan ombak, arus dan angin
- Temperatur

Temperatur yang baik untuk kehidupan dan distribusi makroalga di daerah beriklim dingin berkisar  $0^{\circ}\text{C} - 15^{\circ}\text{C}$ , di daerah yang beriklim hangat  $15^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$ , dan di daerah tropis berkisar  $25^{\circ}\text{C} - 35^{\circ}\text{C}$ . Makroalga di tiap daerah

memiliki temperatur optimal tersendiri untuk tumbuh dan berkembang dengan baik.

- Substrat

Makroalga beradaptasi terhadap tipe substrat yang berbeda-beda. Jenis yang menempati substrat pasir umumnya mempunyai rizoid dan holdfast yang berpenetrasi dalam, sedangkan makroalga yang menempati substrat keras mempunyai holdfast yang berkembang baik, bercabang-cabang atau berbentuk cakram yang mencengkram substrat dengan kuat dan umumnya dijumpai di daerah yang berarus kuat.

#### b. Faktor Kimia

- pH

pH air laut berkisar antara 7,9 – 8,3 condong bersifat alkalin. Ini disebabkan adanya  $\text{CO}_2$  baik dalam bentuk karbonat maupun bikarbonat. Bikarbonat melepaskan  $\text{CO}_2$  bebas dan digunakan oleh alga untuk melakukan fotosintesis.

- Salinitas

Salinitas laut memiliki peranan penting. Kekurangan salinitas menyebabkan perubahan morfologi dan fisiologi dari jenis alga tertentu. Adanya perubahan salinitas merupakan faktor pembatas yang penting bagi pertumbuhan alga dalam lingkungan bahari dan estuaria. Salinitas air laut berkisar antara 30‰ - 37‰.

#### II.1.4 Manfaat

Pembudidayaan alga laut sekarang ini bertujuan untuk memperoleh senyawa kimia yang terkandung di dalamnya. Alga laut yang banyak dimanfaatkan adalah dari jenis alga merah karena mengandung agar-agar, keraginan, porpiran dan furselan. Alga merah juga dimanfaatkan sebagai penghasil yodium (Indriani, 1997; Nontji, 2002;).

Agar-agar, keraginan dan algin umumnya berfungsi sebagai bahan pengental, pembuat gel dan emulsi. sehingga banyak digunakan dalam bidang industri antara lain (Aslan, 1991; Indriani, 1997) :

- Bidang Mikrobiologi : Agar-agar ditambahkan zat tertentu sangat baik digunakan sebagai media pertumbuhan mikroba
- Industri Makanan : Sebagai bahan pengental pada es krim, permen, jeli, selai, mentega dan lain-lain.
- Industri Kosmetik : Sebagai bahan pembentuk gel pada pembuatan salep, krim, lotion, lipstik dan sabun.
- Industri Farmasi : Digunakan sebagai bahan pembuatan obat pencahar dan pembungkus kapsul serta bahan pencetak gigi.
- Industri lainnya seperti pembuatan plat film, pasta gigi, semir sepatu, tekstil, cat, kertas, keramik pestisida dan bahan pengawet.

## II.2 Tinjauan Umum Mikroba Uji

### II.2.1 Klasifikasi, Sifat dan Morfologi Bakteri

#### 1. *Escherichia coli* menurut Garrity (2000) :

Kingdom	: Procaryotae
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

**Sifat dan morfologinya :** *Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang yang lurus dengan ukuran  $0,4 - 0,7 \mu\text{m} \times 1,4 \mu\text{m}$ , bersifat motil dengan flagel peritrikus dan berkapsul. Bakteri ini bersifat aerob atau fakultatif anaerob. *Escherichia coli* adalah bakteri yang ditemukan dalam usus besar manusia dalam jumlah sedikit sebagai flora normal dan jika banyak menimbulkan penyakit (Agus, 1994 ; Jawetz, dkk, 2001).

Sifatnya unik karena dapat menyebabkan infeksi primer pada usus misalnya diare pada anak, juga dapat menimbulkan infeksi pada jaringan tubuh lain di luar usus. *Escherichia coli* menghasilkan enterotoksin yang terdiri atas toksin LT (termolabil) atau ST (termostabil) untuk perlekatan sel kuman pada mukosa usus yang penting di dalam patogenitas diare. Selain itu, *Escherichia coli* juga

menyebabkan penyakit lain yaitu infeksi saluran kemih, pneumonia, meningitis pada bayi baru lahir dan infeksi luka terutama luka di dalam abdomen (Agus, 1994).

2. *Staphylococcus aureus* menurut Garrity (2000) :

Kingdom	: Procaryotae
Phylum	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Familia	: Staphylococcaceae
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>

**Sifat dan morfologinya** : *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif berbentuk kokus yang tidak teratur, kokus tunggal berpasangan, tetrad atau berkelompok seperti buah anggur. Diameter antara 0,8 -1,0  $\mu$  m. Bakteri bersifat aerob dan ada yang fakultatif anaerob, tidak bergerak, tidak berkapsul dan tidak membentuk spora. Bakteri ini terdapat pada kulit dan selaput lendir manusia (Agus, 1994).

*Staphylococcus aureus* adalah suatu bakteri penyebab keracunan yang memproduksi enterotoksin. Bakteri ini tumbuh secara anaerobic fakultatif. *S. aureus* tahan garam dan tumbuh baik pada medium yang mengandung 7,5 % NaCl, serta dapat menfermentasi manitol. Enterotoksin yang diproduksi oleh *S. aureus* bersifat tahan panas, dan masih aktif setelah dipanaskan pada suhu 100°C selama 30 menit. Selain menghasilkan enterotoksin bakteri ini juga menghasilkan eksotoksin berupa

hemolisin yang dapat menyebabkan lisis pada sel darah merah (Agus, 1994 ; Fardiaz, 1992; Jawetz, dkk, 2001).

3. *Bacillus subtilis* menurut Garrity (2000) :

Kingdom	: Procaryotae
Phylum	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Familia	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>
Spesies	: <i>Bacillus subtilis</i>

**Sifat dan morfologinya** : Merupakan bakteri gram positif, berbentuk batang, lonjong dan merupakan bakteri aerobik pembentuk endospora, motil karena memiliki flagel atau adapun yang tidak motil. Terdapat di tanah dan tumbuhan yang sudah membusuk dan bersifat non patogen. Bakteri ini membentuk koloni yang mengkerut berwarna krem sampai coklat dan bila ditumbuhkan dalam medium cair membentuk gumpalan. Dapat digunakan sebagai fungisida untuk tanaman karena tidak berbahaya bagi manusia dan lingkungan (pelczar, 1986).

### II.2.2 Mekanisme Kerja Antibakteri

Pertumbuhan bakteri dapat dikontrol dengan senyawa kimia yang disebut antibakteri. Senyawa antibakteri adalah bahan kimia yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri. Zat pembunuh mikroorganisme itu biasanya

disebut sidal, yang menandakan organisme yang diserangnya, misalnya bakterisida, fungisida, atau agen virus (Brock, 1997).

Senyawa antimikroba dapat memiliki sifat membunuh atau hanya sekedar menghambat. Senyawa yang tidak dapat membunuh akan tetapi hanya sebagai penghambat pertumbuhan dinamakan statis (bakteriostatik, fungistatik, atau agen virustatik). Efek bakteriostatik ditemukan pada saat pertumbuhan dihambat, tetapi tidak membunuh. Zat ini menghambat frekuensi sintesis protein dengan mengikat ribosom. Meskipun ikatan tersebut sangat erat akan tetapi pada saat konsentrasinya menurun zat tersebut dapat bebas dari ribosom dan pertumbuhan dapat dimulai lagi (Brock, 1997).

Zat bakterisidal dapat membunuh sel, tetapi tidak menyebabkan pecahnya sel atau lisis. Zat bakterisidal merupakan zat kimia yang secara umum dapat mengikat erat pada sel target, sedangkan zat bakteriolitik dapat membunuh mikroorganisme dengan cara melisiskan sel, hal ini dapat ditemukan pada sel mikroorganisme tertentu. Zat bakteriolitik adalah antibiotik yang menghambat sintesis dinding sel (Brock, 1997).

Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau bahkan membunuhnya, masing-masing dikenal sebagai "Kadar Hambat Minimal" (KHM). Antibakteri tertentu aktivitasnya dapat meningkat dari bakteriostatik menjadi bakterisida bila kadar antibakterinya ditingkatkan melebihi KHM. Pada percobaan secara *in vitro* dengan metode difusi agar, hal ini dapat dilihat pada besar diameter zona inhibisi yang luas dan bening di sekeliling antibakteri, maka



hal ini menunjukkan bahwa antibakteri tersebut berpotensi tinggi terhadap mikroba uji yang digunakan (Ganiswarna, dkk, 1995).

### **II.3 Ekstraksi Bahan Alam**

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Proses ekstraksi ini didasarkan atas perpindahan massa komponen aktif yang ada dalam simplisia ke dalam pelarut. Setelah pelarut menembus lapisan permukaan dinding sel, zat aktif yang terlarut berdifusi karena terjadinya perbedaan konsentrasi di dalam dan di luar sel (Ganiswarna, 1995).

Jenis ekstraksi ada dua macam yaitu secara panas dan secara dingin. Ekstrak secara panas dilakukan dengan refluks, soklet dan destilasi uap, sedangkan ekstraksi dingin dilakukan dengan macerasi dan perkolasi. Umumnya untuk mengestrak senyawa bioaktif alami adalah dengan cara dingin karena senyawa – senyawa bioaktif tersebut umumnya bersifat kurang stabil terhadap panas (Tobo, 2001).

Ada beberapa metode ekstraksi yang biasa digunakan yaitu (Tobo, 2001):

#### **1. Ekstraksi Secara Maserasi**

Maserasi merupakan cara penyarian sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari yang digunakan adalah metanol, dimana metanol akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi di dalam dan di luar sel.

Maserasi digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung zat aktif yang mudah larut dalam cairan penyari, tidak mengandung benzoin, sitrat, dan lain-lain. Cairan penyari yang digunakan dapat berupa air, etanol dan pelarut lain. Bila penyari yang digunakan adalah air maka untuk mencegah timbulnya kapang, dapat ditambahkan bahan pengawet, yang diberikan pada awal penyarian. Keuntungan cara penyarian dengan maserasi adalah pengerjaan dan peralatan yang digunakan sangat sederhana dan mudah diusahakan.

## 2. Ekstraksi Secara Infundasi

Infundasi merupakan proses penyarian yang umum digunakan untuk menyari zat kandungan aktif yang larut dalam air dari bahan-bahan nabati. Infus adalah sediaan cairan yang dibuat dengan cara menyari simplisia dengan air pada suhu 90° C selama 15 menit. Penyarian dengan cara ini menghasilkan sari yang tidak stabil dan dapat dengan mudah dicemari kapang dan kuman. Oleh sebab itu sari yang diperoleh tidak dapat disimpan lebih dari 24 jam.

## 3. Ekstraksi Secara Perkolasi

Perkolasi merupakan cara penyarian dengan cara mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Serbuk simplisia ditempatkan pada bejana silinder yang bagian bawahnya diberi sekat berpori. Cairan penyari dialirkan dari atas ke bawah melalui serbuk tersebut. Cairan penyari akan melarutkan zat aktif sel-sel yang dilalui sampai mencapai keadaan jenuh.

#### 4. Ekstraksi Secara Penyarian Berkesinambungan

Penyarian berkesinambungan merupakan proses penyarian yang menggabungkan antara proses yang menghasilkan ekstrak cair dan penguapan.

### II.4 Metode Pemisahan

#### II.4.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Cara pemisahan dengan adsorpsi pada lapisan tipis adsorben dikenal dengan kromatografi lapis tipis (Thin Layer Chromatography atau TLC). Adsorben merupakan serbuk halus yang dibuat secara merata dan tipis (0,1 – 0,2 mm) diatas lempeng kaca sebagai fase diam dan cairan pengembang sebagai fase gerak. Karena adanya perbedaan daya serap adsorben terhadap komponen, maka komponen akan bergerak dengan kecepatan yang berbeda. Hal ini yang menyebabkan terjadinya pemisahan (Anonim, 1986; Poole, 1991).

Ada 4 jenis adsorben yang umum dipakai ialah silika gel (asam silikat), alumina (aluminium oxide), keiselguhr (diatomeous earth), dan selulosa. Dari keempat jenis adsorben tersebut, yang paling banyak digunakan ialah silika gel. Ada beberapa jenis silika gel, yaitu (Gritler, Bobbits dan Scwarming, 1991):

##### a. Silika Gel G

Silika gel G adalah silika gel yang mengandung 13% kalsium sulfat sebagai perekat.

##### b. Silika Gel H

Perbedaan silika gel G dan silika gel H ialah, bahwa silika gel H tidak mengandung perekat kalsium sulfat. Silika gel H digunakan untuk pemisahan yang bersifat spesifik, terutama lipida netral.

c. Silika Gel PF

Jenis silika gel ini, memungkinkan senyawa-senyawa organik yang terikat pada plat ini dapat mengadakan fluoresensi. Oleh karena itu visualisasinya dapat dikerjakan dengan menempatkan plat pada ruangan gelap atau dengan sinar UV yang bergelombang pendek.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan bagian dari kromatografi cairan dimana pada fase stasioner terbentuk lapisan tipis pada permukaan plat. KLT merupakan teknik yang meliputi teknik elektroforesis dan kromatografi kertas. KLT merupakan metodologi yang sederhana dan memudahkan dalam visualisasi sample serta dapat digunakan untuk memisahkan berbagai senyawa seperti ion-ion organik, senyawa-senyawa organik baik yang sangat sesuai untuk skrining sample untuk mendeterminasi sample yang dibebaskan dengan memilih kecepatan system penghancuran yang sesuai untuk pemisahan (Anonim, 1986; Atnan, 1997).

#### **II.4.2 RF (Retardation Faktor)**

Untuk mengidentifikasi senyawa-senyawa yang terpisah pada lapisan tipis lebih baik dikerjakan dengan pereaksi kimia dan reaksi-reaksi warna. Tetapi lazimnya untuk identifikasi dengan menggunakan nilai Rf pada lapisan tipis kurang tepat bila dibandingkan pada kertas. Seperti halnya pada kertas, identifikasi harga Rf didefinisikan sebagai berikut (Atnan, 1997) :

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}}$$

Faktor-faktor yang mempengaruhi gerakan noda dalam KLT yang juga mempengaruhi harga Rf (Atnan, 1997) :

1. Struktur kimia dari senyawa yang dipisahkan
2. Sifat dari penyerap dan derajat aktivitasnya
3. Tebak dan kerataan dari lapisan penyerap
4. Pelarut dan derajat kemurnian fase bergerak
5. Derajat kejenuhan dari uap
6. Teknik percobaan
7. Jumlah cuplikan yang digunakan
8. Suhu
9. Kesetimbangan

#### **II.4.3 Uraian Umum Bioautografi**

Bioautografi adalah metode pendeteksian untuk penemuan senyawa yang belum teridentifikasi dengan melokalisasi aktifitas anti mikroba pada kromatogram. Metode ini didasarkan atas efek biologi (antibakteri, antiprotozoa, antitumor, dan lain-lain) dari substansi yang diteliti. Dibandingkan dengan kromatografi kertas, kromatografi Lapis Tipis mempunyai kekuatan pemisahan yang lebih besar dan lebih cepat dari kedua teknik tersebut. Ciri khas dari prosedur bioautografi adalah didasarkan atas teknik difusi agar, dimana senyawa antibakteri dipindahkan dari

lapisan kromatografi ke medium agar yang telah diinokulasi. Zone inhibisi ditampakkan oleh aktifitas dehidrogenase dari pereaksi pendeteksi. Prosedur ini mempunyai beberapa kekurangan dan kemudian diperbaiki dengan melakukan modifikasi tertentu (Betina, 1972; Hostettman, 1995).

Bioautografi dapat dipertimbangkan paling efisien untuk mendeteksi komponen antimikroba sebab dapat melokalisir aktivitas meskipun dalam senyawa kompleks dan dapat langsung diisolasi dari komponen yang aktif (Rios, Recio dan Villar 1998).

Bioautografi dapat dibagi dalam 3 kelompok yaitu (Betina, 1972; Hostettman, 1995; Rios, Recio dan Villar, 1998) :

- a. Bioatografi Langsung, dimana mikroorganisme tumbuh secara langsung diatas lempeng Kromatografi Lapis Tipis.
- b. Bioautografi Kontak, dimana senyawa antimikroba dipindahkan dari lempeng KLT ke medium agar yang telah diinokulasi melalui kontak langsung.
- c. Bioautografi Pencelupan, dimana medium agar telah diinokulasikan dengan suspensi bakteri dituang diatas lempeng KLT.

Beberapa prosedur bioautografi masing-masing mempunyai kelebihan dan kekurangan. Bioautografi kontak merupakan tipe yang paling sering digunakan. Masalah perbedaan difusi dari senyawa-senyawa dari kromatogram ke plat agar dipermudah dengan deteksi bioautografi secara langsung, tetapi metode ini membutuhkan peralatan mikrobiologi yang cukup rumit. Sedangkan bioautografi secara langsung digunakan untuk aktifitas antibakteri yang sangat sensitive dan

melokalisir senyawa-senyawa yang aktif, tetapi mempunyai kekurangan karena keterbatasan mikroorganisme yang dapat tumbuh secara langsung di atas lapisan kromatografi. Keterbatasan bakteri pada lempeng dan memungkinkan terjadi kontaminasi sedang metode bioautografi pencelupan merupakan metode yang paling tepat sebab tidak dipengaruhi oleh kemungkinan adanya kontaminasi (Rahalison, 1991; Rios, Recio dan Villar, 1998).

Senyawa murni kadang-kadang dapat diperoleh setelah satu kali kromatografi saja tetapi yang lebih sering, kita memerlukan kombinasi metode., misalnya isolasi senyawa alam dari sumber tumbuhan berarti kita mencari satu senyawa dari ekstrak yang mengandung beberapa komponen. Untuk memperoleh senyawa hasil reaksi dari tahap sintetik mungkin hanya memerlukan pemisahan satu senyawa hasil samping. (Hostettman, 1995).

Masalah pada pendekatan yang melibatkan kombinasi metode untuk mengisolasi senyawa tertentu ialah memilih cara (strategi pemisahan). Pada beberapa kasus, khususnya senyawa alam bahari yang mudah larut dalam air, pemilihan itu mungkin merupakan peristiwa coba-coba. Pemilihan strategi pemisahan bergantung pada sejumlah faktor (Hostettman, 1995) :

- cara ekstraksi (termasuk langkah partisi cair-cair);
- kepolaran cuplikan
- kerumitan ekstrak atau campuran
- adanya cara-cara pemisahan yang saling melengkapi
- kestabilan cuplikan



## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### III.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Cawan petri (Pyrex), Gelas piala (Pyrex), Erlenmeyer (Pyrex), Cuvet (Pyrex), Tabung reaksi (Pyrex), Gelas ukur (Pyrex), Labu semprot, Inkubator (Heraeus), Oven (Heraeus), Otoklaf (All American), Timbangan analitik (Ohaus), Neraca (Ohaus), Spektrofotometer (Bausch & Lomb), Bejana maserasi, Corong pisah, Gelas kimia (Pyrex), Chamber kromatografi, Pipa kapiler, Enkas, Jangka sorong, Hot plate (Solid State Magnetic), kertas cakram, Ose, Lampu UV  $\lambda$  254 & 366 nm, Lempeng Kromatografi Lapis Tipis (KLT), dan Rotavapor.

#### III.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Halymenia durvillae* J.G. Agardh, Biakan murni *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, dan *Staphylococcus aureus*, NaCl Fisiologis 0,9% steril, Heksan, Etil asetat, Metanol, Air suling, Agar (Difco), Pepton (Difco), Yeast ekstrak/Ekstrak Khamir (Merck), Beef Ekstrak/Ekstrak daging (Difco), Alkohol 70 %, spritus, Glukosa (Merck), kertas pH universal, kertas whatman dan kertas cakram.



### **III.3 Cara Kerja**

#### **III.3.1 Penyiapan Alat dan Bahan**

##### **a. Sterilisasi Alat**

Semua alat yang akan digunakan dicuci bersih kemudian dikeringkan. Untuk peralatan gelas dan tahan panas seperti cawan petri, erlenmeyer, gelas ukur, tabung reaksi, dll dibungkus dengan kertas kemudian disterilkan dalam oven pada suhu 180°C selama 2 jam, sedangkan peralatan non gelas yang dapat rusak, tidak tahan panas seperti spuit dibungkus aluminium foil dan bahan-bahan / media yang akan digunakan disterilisasi dalam otoklaf pada suhu 121°C tekanan 2 atm selama 15 menit. Sedangkan Ose dan pinset disterilkan dengan cara mencelupkan ke dalam alkohol 70% kemudian dipijarkan dengan menggunakan api spiritus.

##### **b. Pembuatan Medium**

Medium yang digunakan yaitu :

###### **1. Medium Nutrien Agar**

Komposisi medium NA untuk 100 ml ditimbang ekstrak daging 0,30 gram, pepton 0.50 gram, dan agar 2 gram kemudian dilarutkan dalam 100 ml air suling. Selanjutnya bahan yang telah tercampur dipanaskan diatas penangas sambil diaduk sampai larut. Lalu pH-nya diatur hingga mencapai 7,0. Setelah itu medium disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

## 2. Medium Glukosa Nutrien Agar (GNA)

Komposisi medium GNA untuk 500 ml ditimbang glukosa 5 gram, ekstrak daging 2,5 gram, pepton 5 gram, NaCl 1,75 gram dan agar 7,5 gram kemudian dilarutkan dalam 500 ml air suling. Selanjutnya bahan yang telah tercampur dipanaskan diatas penangas sambil diaduk sampai larut. Lalu pH-nya diatur hingga mencapai hingga 7,0. Setelah itu medium disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

### III.3.2 Pengambilan Sampel

Sample yang digunakan adalah *Halymenia durvillaei* yang diambil di perairan pulau Lae-lae, Kecamatan Ujung Tanah, Makassar. (Lamp.1)

### III.3.3 Ekstraksi Sampel

Talus dari *Halymenia durvillaei* yang telah diambil dicuci hingga bersih. setelah itu dipotong kecil-kecil, lalu ditimbang 100 gram kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender. Lalu dimasukkan kedalam bejana maserasi lalu dituangi dengan metanol sebanyak 200 ml, diaduk dan didiamkan selama 1 x 24 jam. Setelah itu disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 3500 rpm, kemudian disaring, ampas yang diperoleh diekstraksi lagi 2 x 100 ml metanol. Hasil ekstraksi yang diperoleh kemudian diuapkan dengan menggunakan rotavapor kemudian dilanjutkan lagi dengan proses liofilisasi dengan menggunakan Freeze Dryer sampai diperoleh ekstrak kering. Kemudian ampas terakhir diekstraksi kembali dengan menggunakan pelarut heksan sebanyak 200 ml selama 4 hari, setelah itu disaring dan ampas yang diperoleh diekstrak lagi dengan pelarut heksan sebanyak 200 ml selama 4

hari. Kemudian hasil ekstraksinya dikisatkan dengan menggunakan rotavapor sampai diperoleh ekstrak kental.

#### **III.3.4 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Sampel**

Ekstrak metanol *Halymenia durvillaei* dengan konsentrasi 0,1 %, 1 % dan 10 % dibuat dengan cara menimbang ekstrak kental sampel sebanyak 0,1 gr, 1 gr dan 10 gr lalu masing-masing dilarutkan dalam 100 ml air suling, Kemudian dilakukan hal yang sama untuk ekstrak heksan

#### **III.3.5 Penyiapan Bakteri**

##### **a. Peremajaan Bakteri**

Bakteri uji berupa bakteri *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* yang berasal dari biakan murni, masing-masing diambil 1 ose lalu diinokulasikan dengan cara digoreskan pada medium Nutrien Agar miring lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

##### **b. Pembuatan Suspensi Bakteri**

Bakteri uji hasil peremajaan disuspensikan dengan 5 ml NaCl fisiologis 0,9% steril. Kemudian diukur kepadatannya dengan menggunakan spektrofotometer pada 25 % T dengan panjang gelombang 580 nm.

### III.3.6 Pengujian Ekstrak Sampel *Halymenia durvillaei*

#### a. Pengujian Daya Hambat

Suspensi bakteri uji sebanyak 1 ml dimasukkan kedalam cawan petri. Medium Glukosa Nutrien Agar (GNA) steril dengan suhu  $40^{\circ}\text{C} - 45^{\circ}\text{C}$  dituang secara aseptik kedalam cawan petri sebanyak 15 - 20 ml, lalu dihomogenkan dengan cara memutar-mutar cawan petri secara perlahan dan dibiarkan memadat. Selanjutnya pada permukaan medium GNA diletakkan kertas cakram yang telah direndam dalam ekstrak *Halymenia durvillaei* masing-masing pada konsentrasi 0,1 %, 1 % dan 10 % selama 5 menit dengan jarak satu kertas cakram dengan yang lain  $\pm 3$  cm. Kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam lalu diukur daerah hambatan yang terbentuk. Kemudian inkubasi dilanjutkan kembali selama 1 x 24 jam untuk melihat sifat dari senyawa aktif yang dikandung dalam ekstrak tersebut. Sebagai kontrol negatif digunakan air suling.

#### b. Pemisahan Senyawa Secara Kromatografi Lapis Tipis

Lempeng diaktifkan terlebih dahulu dengan pemanasan dalam oven pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit. Kemudian ekstrak *Halymenia durvillaei* dengan konsentrasi 10% ditotolkan pada lempeng KLT yang berukuran 8 x 2 cm dengan menggunakan pipa kapiler kira-kira 1 cm dari tepi bawah lempeng dan dibiarkan beberapa saat, lalu dielusikan dengan eluen etil asetat : Metanol : Air (10 : 2 : 1) dan Heksan : Etil asetat (3 : 1) yang sesuai dalam chamber jenuh. Lempeng dibiarkan terendam dalam cairan pengelusi hingga 0,5 cm dari tepi atas lempeng. Lalu lempeng dikeluarkan dari chamber dan di angin-anginkan hingga cairan pengelusnya menguap kemudian

diamati dibawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm. Noda-noda yang memberikan fluoresensi diberi tanda pada lempeng. Selanjutnya noda-noda tersebut diukur nilai Rf-nya.

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}}$$

### **c. Pengujian Bioautografi**

Suspensi bakteri uji di pipet sebanyak 1 ml kedalam cawan petri kemudian dituangi dengan medium Glukosa Nutrien Agar steril sebanyak 15 ml dan dibiarkan memadat. Setelah medium memadat lempeng KLT yang telah dielusi diletakkan diatas medium agar selama 30 menit lalu diangkat. Medium GNA kemudian di inkubasi pada 37<sup>0</sup> C selama 1 x 24 jam. Setelah masa inkubasi diamati noda yang memberikan daerah hambatan, noda yang memperlihatkan aktivitas antibakteri diidentifikasi.

### **d. Uji Identifikasi Kromatogram Hasil KLT Menggunakan Beberapa Penampak Noda**

Lempeng KLT diaktifkan dengan pemanasan dalam oven pada suhu 100<sup>0</sup>C selama 30 menit sebelum digunakan. Kemudian ekstrak metanol ditotolkan pada lempeng KLT ukuran 8 x 2 cm menggunakan pipa kapiler. Ekstrak sample masing – masing ditotolkan pada lempeng KLT dibiarkan beberapa saat hingga kering dan dimasukkan dalam bejana kromatografi yang sudah jenuh dengan cairan eluen etil asetat : Metanol : Air (10 : 2 : 1) dan Heksan : Etil asetat ( 3 : 1 ). Dibiarkan

menyebar sampai batas 0,5 cm dari tepi atas lempeng. Lempeng dikeluarkan dari bejana dan diangin-anginkan hingga cairan eluennya menguap diamati noda di bawah lampu UV 366 nm lalu kromatogram disemprotkan dengan (Auterhoff dan Kovar, 2002) :

1. Pereaksi Vanilin- asam sulfat (1 gram vanillin dilarutkan dalam 100ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50%) lalu kromatogram tersebut dimasukkan dalam oven pada suhu 110 °C selama 5 – 10 menit lalu diamati warna yang ditampakkan noda. Positif mengandung terpenoid jika warna ungu;
2. Pereaksi Asam perklorat ( HClO<sub>4</sub> ) 20% (20 ml asam perklorat dilarutkan dalam 100 ml air) lalu kromatogram tersebut dimasukkan dalam oven pada suhu 100 °C selama 5 – 10 menit lalu diamati warna noda yang tampak. Positif mengandung steroid jika warna biru atau kuning kehijauan atau merah jambu;
3. Pereaksi Libermann - Burchard (campuran H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat 1 ml, anhidrida asetat 20 ml dan kloroform 50 ml) lalu kromatogram tersebut dimasukkan dalam oven pada suhu 100 °C selama 5 – 10 menit lalu diamati warna noda yang tampak. Positif mengandung steroid jika warna biru dan Positif mengandung terpenoid jika warna hijau kebiruan;
4. Pereaksi Dragendrof lalu kromatogram tersebut dimasukkan dalam oven pada suhu 100 °C selama 5 – 10 menit lalu diamati warna noda yang tampak. Positif mengandung alkaloid jika warna jingga.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Penentuan Diameter Hambatan

Pada penelitian ini dilakukan pengujian daya hambat ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus*. Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan teknik difusi yang dilanjutkan dengan metode KLT-Bioautografi. Digunakan 3 konsentrasi yang berbeda yaitu 0,1 %; 1 %; dan 10 % dengan aquades steril sebagai kontrol negatif. Metode difusi dilakukan untuk mengetahui besarnya diameter zona hambatan yang terbentuk.

Hasil pengukuran diameter hambatan ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* diperlihatkan pada tabel 1 berikut ini :

Tabel 1. Rata-rata hasil pengukuran diameter hambatan ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh dengan larutan penyari metanol dan heksan terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* masa inkubasi 1 x 24 jam

Jenis Bakteri	Diameter Zona Hambatan (mm)						Kontrol (-)
	Metanol			Heksan			
	0,1%	1 %	10%	0,1%	1 %	10%	
<i>Escherichia coli</i>	6,78	7,93	9,85	6,05	6,83	8,23	0
<i>Bacillus subtilis</i>	6,95	8,55	9,03	6,7	6,85	7,1	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,58	8,53	11,08	6,75	7,55	8,1	0



Hasil pengukuran diameter zona hambatan memperlihatkan bahwa ekstrak metanol *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh dengan menggunakan konsentrasi 0,1 %; 1 %; dan 10 % terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* yang digunakan dengan masa inkubasi 1 x 24 jam menunjukkan bahwa ekstrak tersebut memperlihatkan daerah bening. Terbentuknya daerah bening disebabkan karena adanya zat antibakteri dalam ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh yang berdifusi di sekitar kertas cakram sehingga mengakibatkan pertumbuhan bakteri disekitarnya menjadi terhambat.

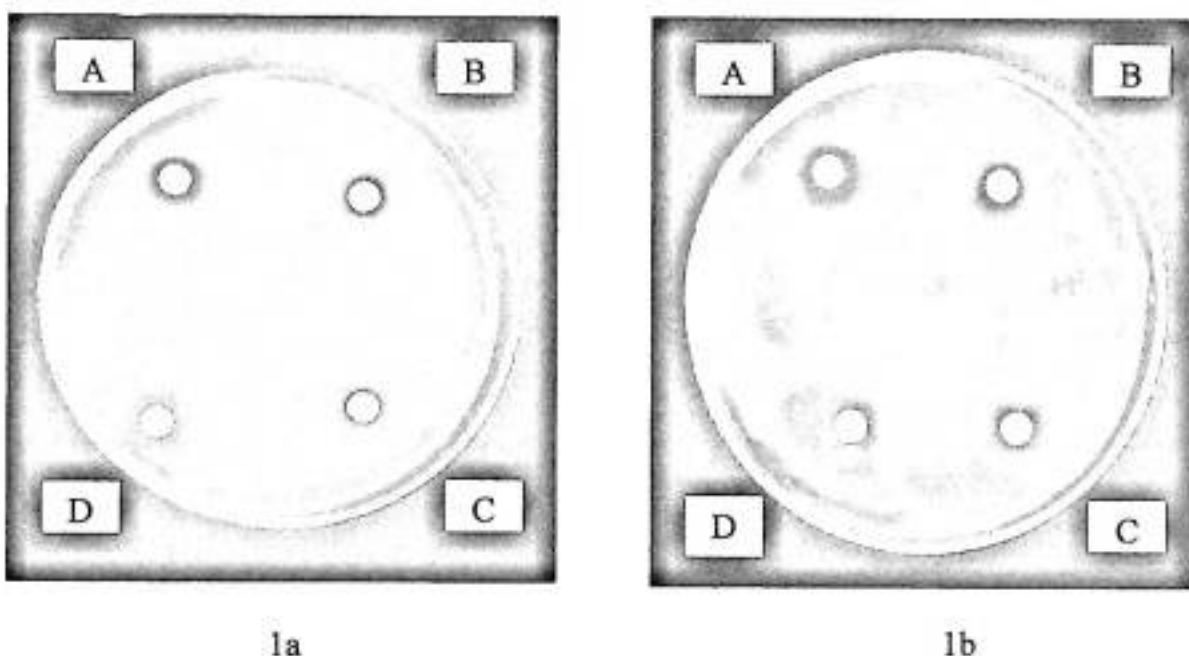
Uji daya hambat pada bakteri *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* memperlihatkan bahwa semakin tinggi konsentrasi sampel uji, maka semakin besar pula penghambatannya terhadap bakteri uji. Hal ini disebabkan karena makin besar konsentrasi ekstrak yang digunakan maka makin besar pula senyawa aktif yang berefek antibakteri yang terdapat didalamnya. Menurut Cappucino dan Sherman (1978), peningkatan konsentrasi umumnya diikuti dengan peningkatan diameter daerah hambatan, dan konsentrasi bahan kimia akan mempengaruhi mikroorganisme, dimana konsentrasi tertinggi akan menyebabkan lebih banyak kematian mikroorganisme.

Lebih lanjut dikatakan bahwa besar kecilnya zona hambatan merupakan tolak ukur bioaktivitas yang dipengaruhi oleh berbagai faktor antara lain substansi bioaktif, kadar substansi aktif serta jumlah inokulasi bakteri / kepadatan bakteri uji. Menurut Harbone 1987 senyawa-senyawa yang larut pada fraksi non polar heksan antara lain



terpenoid, steroid dan karetenoid sedangkan yang larut dalam fraksi asam etil asetat antara lain asam pemat karboksilat, flavonoid dan fenil profanoid (Tobo, 2001).

Zona hambatan ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh dengan menggunakan penyari metanol dan heksan terhadap *Escherichia coli* diperlihatkan pada gambar 1 berikut ini :



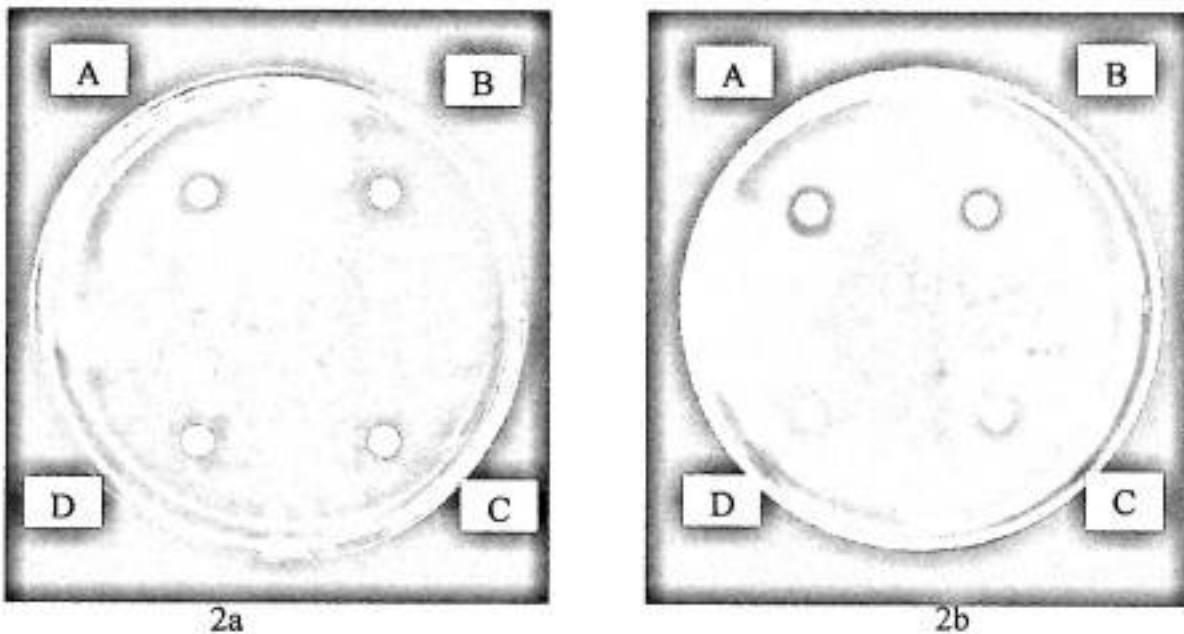
- Gambar 1a. Zona hambatan ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh dengan menggunakan penyari metanol terhadap *Escherichia coli*, masa inkubasi 1 x 24 jam.
- 1b. Zona hambatan ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh dengan menggunakan penyari heksan terhadap *Escherichia coli*, masa inkubasi 1 x 24 jam.

Keterangan :

A : Konsentrasi Ekstrak 10 %  
B : Konsentrasi Ekstrak 1 %

C : Konsentrasi ekstrak 0,1 %  
D : Kontrol Negatif

Zona hambatan ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh dengan menggunakan penyari metanol dan heksan terhadap *Bacillus subtilis* diperlihatkan pada gambar 2 berikut ini :



- Gambar 2a. Zona hambatan ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh dengan menggunakan penyari metanol terhadap *Bacillus subtilis*, masa inkubasi 1 x 24 jam.
- 2b. Zona hambatan ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh dengan menggunakan penyari heksan terhadap *Bacillus subtilis*, masa inkubasi 1 x 24 jam.

Keterangan :

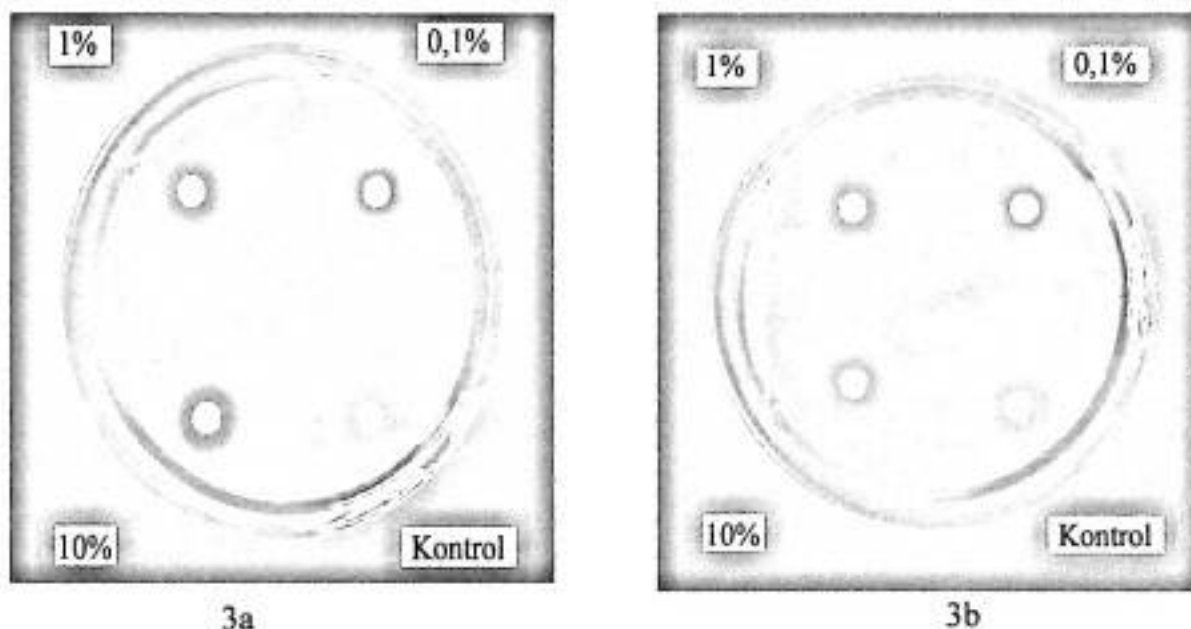
A : Konsentrasi Ekstrak 10 %

B : Konsentrasi Ekstrak 1 %

C : Konsentrasi ekstrak 0,1 %

D : Kontrol Negatif

Zona hambatan ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh dengan menggunakan penyari metanol dan heksan terhadap *Staphylococcus aureus* diperlihatkan pada gambar 3 berikut ini :



- Gambar 3a. Zona hambatan ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh dengan menggunakan penyari metanol terhadap *Staphylococcus aureus*, masa inkubasi 1 x 24 jam.
- 3b. Zona hambatan ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh dengan menggunakan penyari heksan terhadap *Staphylococcus aureus*, masa inkubasi 1 x 24 jam.

Diameter zona hambatan yang terbentuk pada *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* berbeda-beda. Ini menunjukkan bahwa sensitifitas ketiga jenis bakteri uji ini berbeda terhadap potensi suatu zat antibakteri. Demikian pula sebaliknya, antibakteri mempunyai sifat menghambat dan membunuh bakteri yang berbeda pula. Perbedaan sensitifitas ini disebabkan karena adanya perbedaan

sifat yang berbeda. Suatu jenis bakteri akan membentuk resistensi dalam dirinya yang merupakan mekanisme alamiah untuk mempertahankan hidupnya (Pelczar, 1986).

Setelah masa inkubasi 2 x 24 jam, diperoleh bahwa pada daerah hambatan yang terbentuk mulai ditumbuhi oleh bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak *Halymenia durvillaei* itu bersifat bakteriostatik, yaitu hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri tapi tidak sampai mematikan (bakterisida).

Sifat suatu antibakteri dapat disimpulkan sebagai bakteriostatik atau bakterisida dengan membandingkan hasil pengukuran diameter hambatan antara masa inkubasi 24 jam dengan 48 jam. Hasil analisis ini sejalan dengan pernyataan Wattimena (1991) yang menyatakan bahwa suatu senyawa bioaktif dikatakan bersifat bakteriostatik apabila senyawa bioaktif tersebut berkhasiat menghambat pertumbuhan mikroba tapi tidak mematikan yang ditandai dengan zona hambatan yang menjadi keruh/ditumbuhi kembali oleh bakteri setelah masa inkubasi 48 jam. Sebaliknya, suatu senyawa bioaktif dikatakan bersifat bakterisida apabila senyawa bioaktif tersebut berkhasiat mematikan dan menghentikan pertumbuhan mikroba yang ditandai dengan zona hambatan yang tetap bening setelah masa inkubasi 48 jam.

#### **B. pemisahan senyawa secara kromatografi lapis tipis**

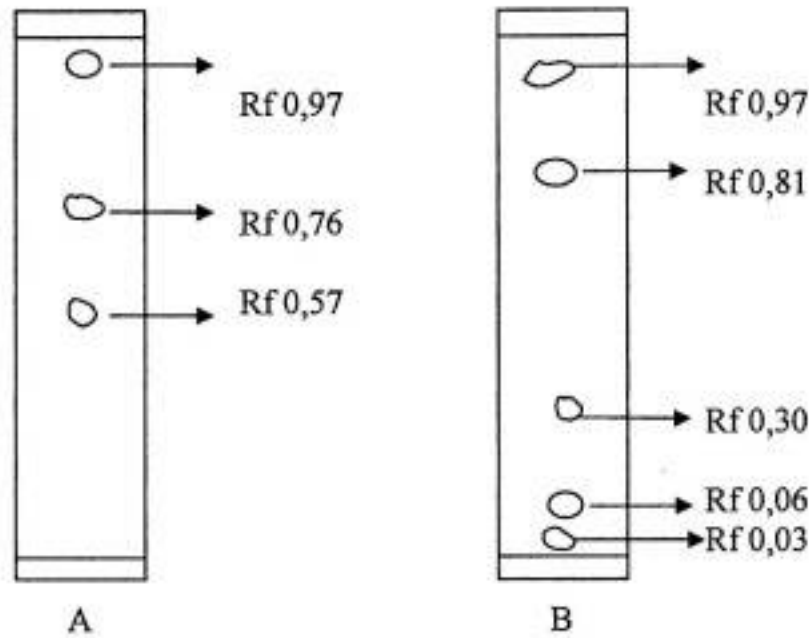
Pemisahan senyawa dari ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh dilakukan secara kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan menggunakan 2 eluen yang berbeda yaitu Etil asetat : Metanol : Air (10 : 2 : 1) dan Heksan : Etil asetat (3 : 1) dengan penampak noda sinar UV 366 nm.

Hasil pemisahan secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan menggunakan cairan pengelusi Etil asetat : Metanol : Air (10 : 2 : 1) untuk ekstrak *Halymenia durvillaei* dengan menggunakan penyari metanol dan eluen Heksan : Etil asetat (3 : 1) untuk ekstrak *Halymenia durvillaei* dengan menggunakan penyari heksan diperlihatkan pada tabel 2 berikut ini :

Tabel 2 . Pemisahan secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sampel	Eluen Etil asetat : Metanol : Air		Eluen Heksan : Etil asetat	
	Jumlah noda	Nilai Rf	Jumlah noda	Nilai Rf
<i>Halymenia durvillaei</i>	3	0,76	5	0,03
J.G. Agardh		0,97		0,30
		0,57		0,97
				0,06
				0,81

Hasil pemisahan secara KLT dengan menggunakan cairan pengelusi Etil asetat : Metanol : air (10 : 2 : 1) terdapat 3 noda, ini menunjukkan adanya 3 komponen senyawa yang larut dalam metanol sedangkan hasil pemisahan dengan cairan pengelusi Heksan : Etil asetat (3 : 1) terdapat 5 Noda, ini menunjukkan adanya 5 komponen senyawa yang larut dalam heksan. Hal ini dapat dilihat pada gambar 4 berikut ini :



Gambar 4. KLT ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh dengan penampak noda sinar UV 366 nm.

Keterangan :

A : Cairan pengemulsi etil asetat : metanol : air (10 : 2 : 1)

B : Cairan pengemulsi Heksana : Etil Asetat (3 : 1)

Penggunaan kedua jenis eluen ini disebabkan karena senyawa – senyawa yang terkandung dalam ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh memiliki sifat dan jenis yang berbeda, terutama senyawa yang berpotensi menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*.

Adanya noda yang dihasilkan pada pemisahan ini disebabkan oleh perbedaan daya serap adsorben terhadap komponen, sehingga noda akan bergerak dengan kecepatan yang berbeda

### C. Pengujian Secara KLT – Bioautografi

Noda – noda yang dihasilkan dari pemisahan secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) kemudian diuji lanjut dengan metode KLT – Bioautografi untuk melihat noda–

noda yang aktif dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*.

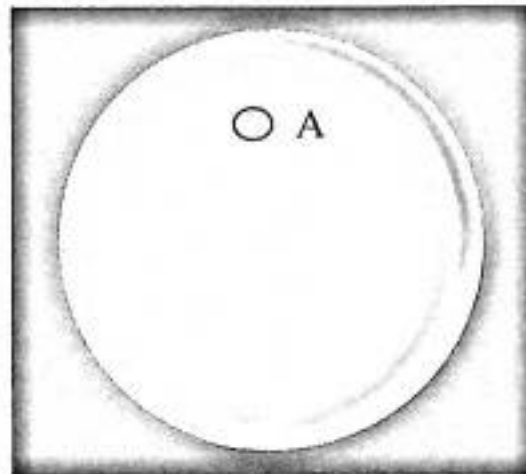
Hasil yang diperoleh pada KLT – Bioautografi dengan menggunakan cairan pengelusi Etil asetat : Metanol : air (10 : 2 : 1) untuk ekstrak *Halymenia durvillaei* dengan menggunakan penyari metanol dan Heksan : Etil asetat (3 : 1) untuk ekstrak *Halymenia durvillaei* dengan menggunakan penyari heksan terhadap *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* diperlihatkan pada tabel 3 berikut :

Tabel 3. Hasil yang diperoleh pada KLT – Bioautografi.

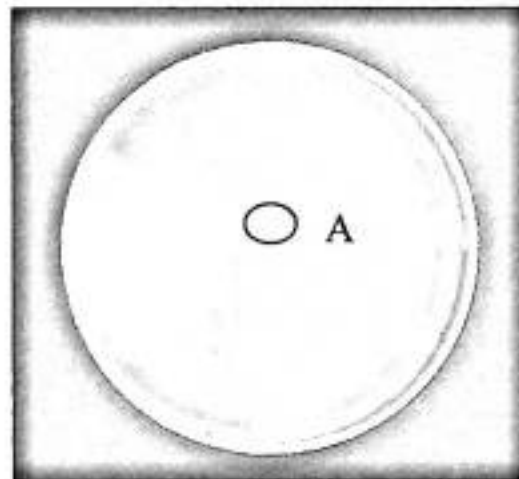
Jenis bakteri	Eluen Etil asetat:Metanol:Air			Eluen Heksan : Etil asetat		
	Jumlah noda	Noda aktif	Nilai Rf	Jumlah noda	Noda aktif	Nilai Rf
<i>Escherichia coli</i>	3	1	0,97	5	1	0,97
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	1	0,76	5	2	0,81
						0,06
<i>Bacillus subtilis</i>	3	1	0,57	5	1	0,30

Hasil yang diperoleh pada KLT- Bioautografi dengan menggunakan cairan pengelusi etil asetat : metanol : air (10 : 2 : 1) diperoleh 3 noda yang aktif dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*. Sedangkan hasil yang diperoleh dengan menggunakan cairan pengelusi heksan : etil asetat (3 : 1) juga diperoleh 5 noda yang aktif menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*.

Hasil yang diperoleh pada KLT – Bioautografi dengan menggunakan eluen etil asetat : metanol : air (10 : 2 : 1) terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* diperlihatkan berturut-turut pada gambar 5, gambar 6 dan gambar 7 berikut ini :



Gambar 5. Bioautogram dengan menggunakan eluen etil asetat : metanol : air (10 : 2 : 1) terhadap *Escherichia coli*  
Keterangan :  
A : Noda 1, Rf 0,97



Gambar 6 . Bioautogram dengan menggunakan eluen etil asetat : metanol : air (10 : 2 : 1) terhadap *Bacillus subtilis*  
Keterangan :  
A : Noda 1, Rf 0,57





Gambar 7 . Bioautogram dengan menggunakan eluen etil asetat : metanol : air (10 : 2 : 1) terhadap *Staphylococcus aureus*

Keterangan :

A : Noda 1, Rf 0,76

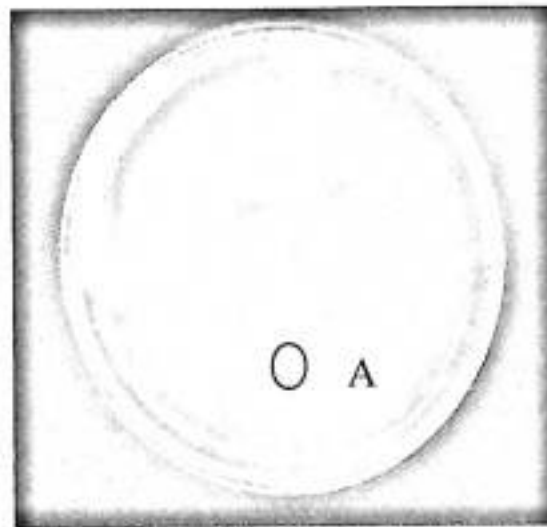
Hasil yang diperoleh pada KLT – Bioautografi dengan menggunakan eluen heksan : etil asetat (3 : 1) terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* diperlihatkan berturut-turut pada gambar 8, gambar 9 dan gambar 10 berikut ini :



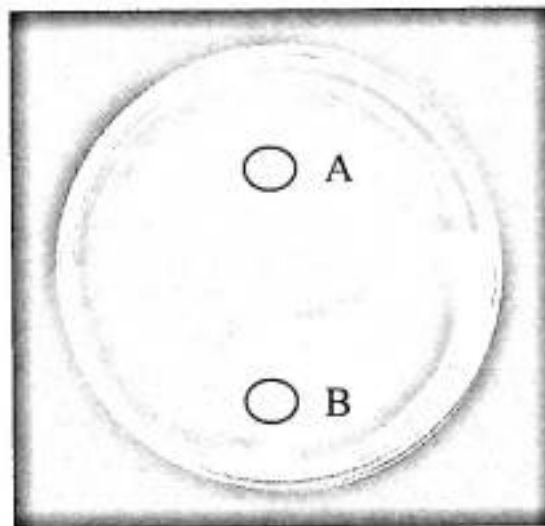
Gambar 8 . Bioautogram dengan menggunakan eluen heksan : etil asetat (3 : 1) terhadap *Escherichia coli*

Keterangan :

A : Noda 1, Rf 0, 97



Gambar 9 . Bioautogram dengan menggunakan eluen heksan : etil asetat (3 : 1) terhadap *Bacillus subtilis*  
Keterangan :  
A : Noda 1, Rf 0,30



Gambar 10 . Bioautogram dengan menggunakan eluen heksan : etil asetat (3 : 1) terhadap *Staphylococcus aureus*  
Keterangan :  
A : Noda 1, Rf 0,81  
B : Noda 2, Rf 0,06

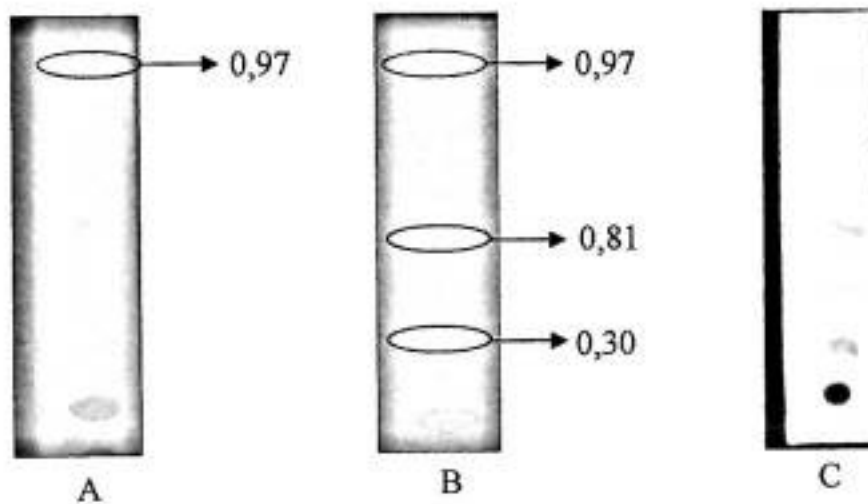
Senyawa antibakteri yang diuji dengan metode KLT-Bioautografi dari ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh menunjukkan bahwa 3 Noda yang terbentuk dengan menggunakan eluen etil asetat : metanol : air (10 : 2 : 1) dan penampak noda sinar UV 366 nm memperlihatkan masing – masing 1 noda yang aktif menghambat pertumbuhan bakteri uji. Noda yang menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* dengan nilai Rf 0,57 sedangkan noda yang menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* memiliki nilai Rf 0,97 dan *Staphylococcus aureus* memiliki nilai Rf 0,76 demikian pula dengan pengujian KLT-Bioautografi yang menggunakan eluen heksan : etil asetat (3 : 1), menunjukkan dari 4 Noda yang terbentuk ditemukan 1 noda yang aktif menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* dengan nilai Rf 0,30 sedangkan pada bakteri *Escherichia coli* terdapat 1 noda yang menghambat pertumbuhan dengan nilai Rf 0,97 dan yang menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* terdapat 2 noda dengan nilai Rf 0,81 dan Rf 0,06

Pada pengujian senyawa antibakteri dengan menggunakan KLT-Bioautografi dipilih metode KLT-Bioautografi kontak, karena metode ini lebih mudah, sederhana dan paling sering digunakan. Dengan bioautografi kontak diperoleh proses perpindahan senyawa aktif ke dalam medium agar yang dapat menghasilkan zona hambatan yang lebih besar dengan nilai Rf yang sama. Dibandingkan dengan metode bioautografi langsung, dimana penyebaran bakteri pada lempeng sering tidak merata dan kemungkinan terjadi kontaminasi lebih besar. Begitu pula dengan bioautografi pencelupan, dimana zona hambatannya sukar untuk diamati. Maka dengan

menggunakan metode bioautografi kontak, ketersebaran bakteri dapat dijamin serta zona hambatannya dapat langsung diamati pada medium agar.

Noda - noda yang menghambat pertumbuhan bakteri uji disebabkan oleh adanya konsentrasi zat sebagai antibakteri yang cukup tinggi dan pemakaian eluen sebagai campuran pelarut organik dengan perbandingan yang berbeda diduga mempengaruhi pemisahan molekul-molekul zat yang terkandung di dalam *Halymenia durvillaeii* J.G. Agardh (Rahalison, 1991).

Hasil identifikasi senyawa antibakteri ekstrak *Halymenia durvillaeii* J.G. Agardh dengan menggunakan penyari heksan dengan penampak sinar UV 366 nm dapat dilihat pada gambar 11 :



Gambar 11. Kromatogram ekstrak *Halymenia durvillaeii* J.G. Agardh dengan menggunakan penyari heksan dengan penampak noda sinar UV 366 nm.

Keterangan :

A : Libermann - Burchard

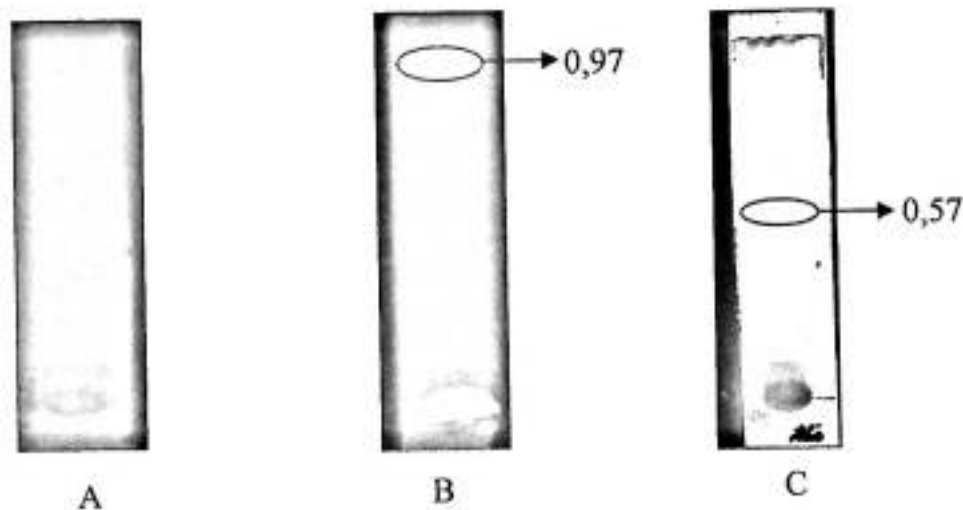
B : Asam Perklorat

C : Vanilin - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Uji kimia dengan menggunakan pereaksi semprot vanillin ( $H_2SO_4$ ) terhadap noda yang mempunyai aktivitas antibakteri pada kromatogram memberikan penampakan warna hijau seharusnya dihasilkan warna ungu. Penyemprotan dengan pereaksi asam perklorat 20% menampakkan warna merah jambu pada nilai Rf 0,81 sedangkan pada nilai Rf 0,30 dan Rf 0,97 menampakkan warna biru, semua menunjukkan bahwa senyawa yang terkandung adalah steroid. Hasil yang diperoleh pada penyemprotan dengan pereaksi Liebermann-Burchard yang menampakkan warna hijau kebiruan pada nilai Rf 0,97 hal ini menunjukkan bahwa pada senyawa antibakteri yang terkandung dalam ekstrak adalah terpenoid

Pada identifikasi alkaloid menggunakan pereaksi Dragendrof tidak dihasilkan warna pada noda, sedangkan untuk senyawa alkaloid seharusnya dihasilkan warna jingga. Hal ini menunjukkan bahwa pemisahan ekstrak metanol *Halymenia durvillaei* dengan eluen heksan : etil asetat ( 3 : 1 ) tidak menunjukkan adanya senyawa alkaloid.

Hasil identifikasi senyawa antibakteri ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh dengan menggunakan penyari metanol dengan penampak sinar UV 366 nm dapat dilihat pada gambar 12 :



Gambar 12. Kromatogram ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh dengan menggunakan penyari metanol dengan penampak noda sinar UV 366 nm.

Keterangan :

A : Liebermann – Burchard

B : Asam Perklorat

C : Vanilin - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Uji kimia dengan menggunakan pereaksi semprot vanillin (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) terhadap noda yang mempunyai aktivitas antibakteri pada kromatogram memberikan penampakan warna ungu pada nilai Rf 0,57 hal ini menunjukkan bahwa senyawa yang terkandung adalah steroid. Penyemprotan dengan pereaksi asam perklorat 20% menampakan warna hijau kebiruan pada nilai Rf 0,97 hal ini menunjukkan bahwa senyawa antibakteri yang terkandung dalam ekstrak adalah terpenoid.

Hasil yang diperoleh pada penyemprotan dengan pereaksi Liebermann-Burchard tidak menampakan warna yang seharusnya berwarna hijau atau biru, hal ini menunjukkan bahwa tidak adanya senyawa steroid yang terdapat dalam ekstrak pemisahan ekstrak metanol *Halymenia durvillaei* dengan eluen etil asetat : metanol :

air (10 : 2 : 1). Dan pada identifikasi alkaloid menggunakan pereaksi Dragendrof dengan eluen etil asetat : metanol : air (10 : 2 : 1) juga tidak dihasilkan warna pada noda, sedangkan untuk senyawa alkaloid seharusnya dihasilkan warna jingga

Pada beberapa noda ada yang tidak menampakkan warna hal ini disebabkan karena pereaksi yang digunakan untuk uji kimia merupakan pereaksi untuk mengidentifikasi senyawa organik sehingga noda yang tidak menampakkan warna itu tergolong senyawa anorganik.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### V.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Uji kimia dengan menggunakan pereaksi libermann – burchard, asam perklorat, vanilin - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> memperlihatkan bahwa senyawa antibakteri yang terkandung dalam *Halymenia durvillaei* adalah dari golongan terpenoid dan steroid.
2. Pemisahan senyawa dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan eluen heksan : etil asetat ( 3 : 1 ) menunjukkan 1 Noda yang aktif menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* dengan nilai Rf 0,30; pada bakteri *Escherichia coli* terdapat 1 noda dengan nilai Rf 0,97 dan pada bakteri *Staphylococcus aureus* terdapat 2 noda dengan nilai Rf 0,06 dan nilai Rf 0,81. Sedangkan dengan menggunakan eluen etil asetat : metanol : air (10 : 2 : 1) menunjukkan 1 noda aktif menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* dengan nilai Rf 0,57; pada bakteri *Escherichia coli* memiliki 1 noda dengan nilai Rf 0,97 dan pada bakteri *Staphylococcus aureus* memiliki 1 noda dengan nilai Rf 0,76.
3. Ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G Agardh bersifat bakteriostatik (dapat menghambat pertumbuhan) *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*.




## V.2 Saran

Sebaiknya dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengidentifikasi struktur kimia dari senyawa yang dihasilkan oleh *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agus, 1994, *Mikrobiologi Kedokteran*. Binarupa Aksara, Jakarta.
- Angka, S.L., 2000, *Bioteknologi Hasil Laut*, PKSPL-IPB, Bogor
- Anonim, 1986, *Sediaan Galenik*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Bhakti Husada, Jakarta
- Auterhoff dan Kovar, 2002, *Identifikasi Obat*, Penerbit ITB, Bandung.
- Aslan, L.M., 1991, *Budidaya Rumpun Laut*, Penerbit Kanisius, Jakarta.
- Atmaja, W.S., 1996, *Pengenalan jenis-jenis Rumpun Laut Indonesia*, Puslitbang Oseanologi LIPI, Jakarta.
- Atnan, M., 1997, *Teknik Kromatografi*, Penerbit ANDI, Jakarta
- Bayard, C., 1993, *Pengantar Biologi Laut*, CV Mosby Company, Amerika Serikat.
- Betina, V., 1972, *Pharmaceutical Application of Thin Layer and Paper Chromatography*, Amsterdam.
- Brock T., 1997. *Biology of Microorganisms, Eighth Edition*. Prentice Hall International, Inc, London.
- Cappuccino, J.G., dan N. Sherman, 1978, *Microbiology A Laboratory Manual*, Rockland Community College, Suffern, New York.
- Dahuri, R., 1996, *Pengelolaan Sumber Daya Wilayah Pesisir dan Lautan Secara Terpadu*, PT. Pradnya Paramita, Jakarta.
- Darmawanti B., 2001, *Identifikasi Jenis-jenis Makroalga Kelas Rhodophyceae di Perairan Pulau Lae-lae*, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Fardiaz, S., 1992, *Mikrobiologi Pangan*, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Ganiswarna, S.G., 1995, *Farmakologi dan Terapi*, Edisi IV, Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta.

- Garrity, G., 2000, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition*, [www.cme.msu.edu](http://www.cme.msu.edu). Akses desember 2005
- Gritler, R.J., J.M. Bobbitts, dan A.E. Swarting, 1991, *Pengantar Kromatografi*, Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Harborne, J.B., 1996. *Metode Fitokimia*. Penerbit ITB, Bandung.
- Hostettman, K., 1995, *Cara Kromatografi Preparatif*, ITB, Bandung
- Indriani, H., 1997, *Budidaya, Pengolahan dan Pemasaran Rumput Laut*, PT. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Jawetz, Melnick dan Adelberg, 2001, *Mikrobiologi Kedokteran*, Salemba Medika, Jakarta.
- Krieg, N.R., 1984, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1*, Baltimore, London.
- Luning, K., 1990, *Seaweeds, Their Environment Biogeography and Ecophysiology*, John Wiley & Sons, New York.
- Leon, R.C., W.R. Wimey-Cook, , 1953, *Textbook of Theoretical Bothany*, Longmans, The Darie Press, New York.
- Nontji, A., 2002, *Laut Nusantara*, Penerbit Djambatan, Jakarta.
- Nurwantoro, Djarijah, S.A., 1997, *Mikrobiologi Pangan Hewani-Nabati*, Kanisius, Yogyakarta.
- Pelczar, J.M., 1986, *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, Jilid I, UI-Press, Jakarta.
- Pasambe, M., 2001, *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Sargassum echinocarpum J. G. Agardh Terhadap Escherichia coli dan Staphylococcus aureus dengan Metode KLT-Bioautografi*, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Poole, C.F., 1991, *Chromatography Today*, El Sevier, Amsterdam
- Rahalison, L., K. Hostettman, 1991, *A Bioautographic Agar Overlay Method for the Detection of Antifungal Compounds from Higher Plants, Phytochemical Analysis*, Vol.2, University de Lausanne, Switzerland.



Rios, j.L., M.c. Recio, dan A. villar, 1998, *Screening Methods for Natural Products With Antimicrobial Activity*, *Journal of Echinopharmacology*, No. 23, Departemen Farmacology, Faculted de Farmacia, Universided Complutenic de Madrid, Madrid.

Surialink, 2006, [www.surialink.com/mb/index.htm](http://www.surialink.com/mb/index.htm). akses 28 april 2006

Tjitrosoepomo, G., 1993, *Taksonomi Tumbuhan Rendah*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

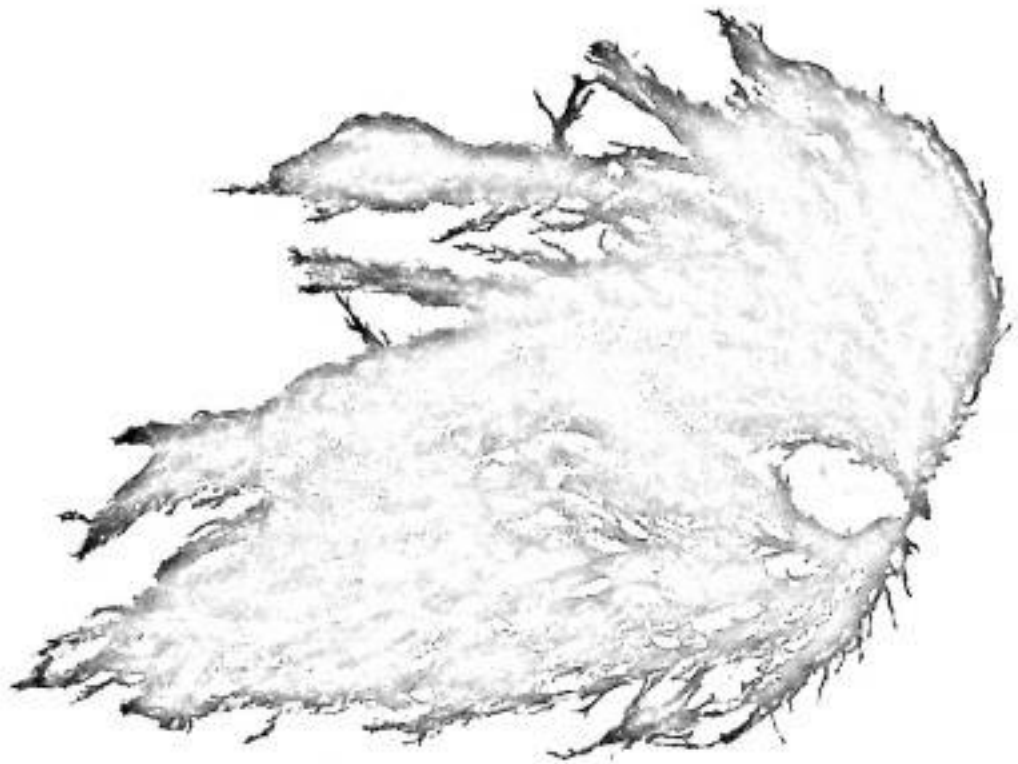
Tobo, F., Mufidah dan B. Taebe, 2001, *Pegangan Laboratorium Fitokimia I*, Laboratorium Fitokimia Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar

Trono, C. Gavino dan T. Edna, 1988. *Phillipine Seaweeds*, National Book Store Inc, Publisher, Metro Manila, Phillipine.

Verheij, E., 1993, *Marine Plants on The Reef of Spermonde Archipelago, SW Sulawesi, Indonesia : Aspects of Taxonomy, Floristics and Ecology*, Rijksherbarium-Hortus Botanicus, Leiden, Netherlands.

Wattimena, J.R., 1991, *Farmakodinamika dan Terapi Antibiotik*, Universitas Gadjah Mada Press, Yogyakarta.

Lampiran 1.



Gambar 13. Sampel *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh

Lampiran 2.

KOMPOSISI MEDIUM

1. Medium Nutrien Agar (NA)

Komposisi :

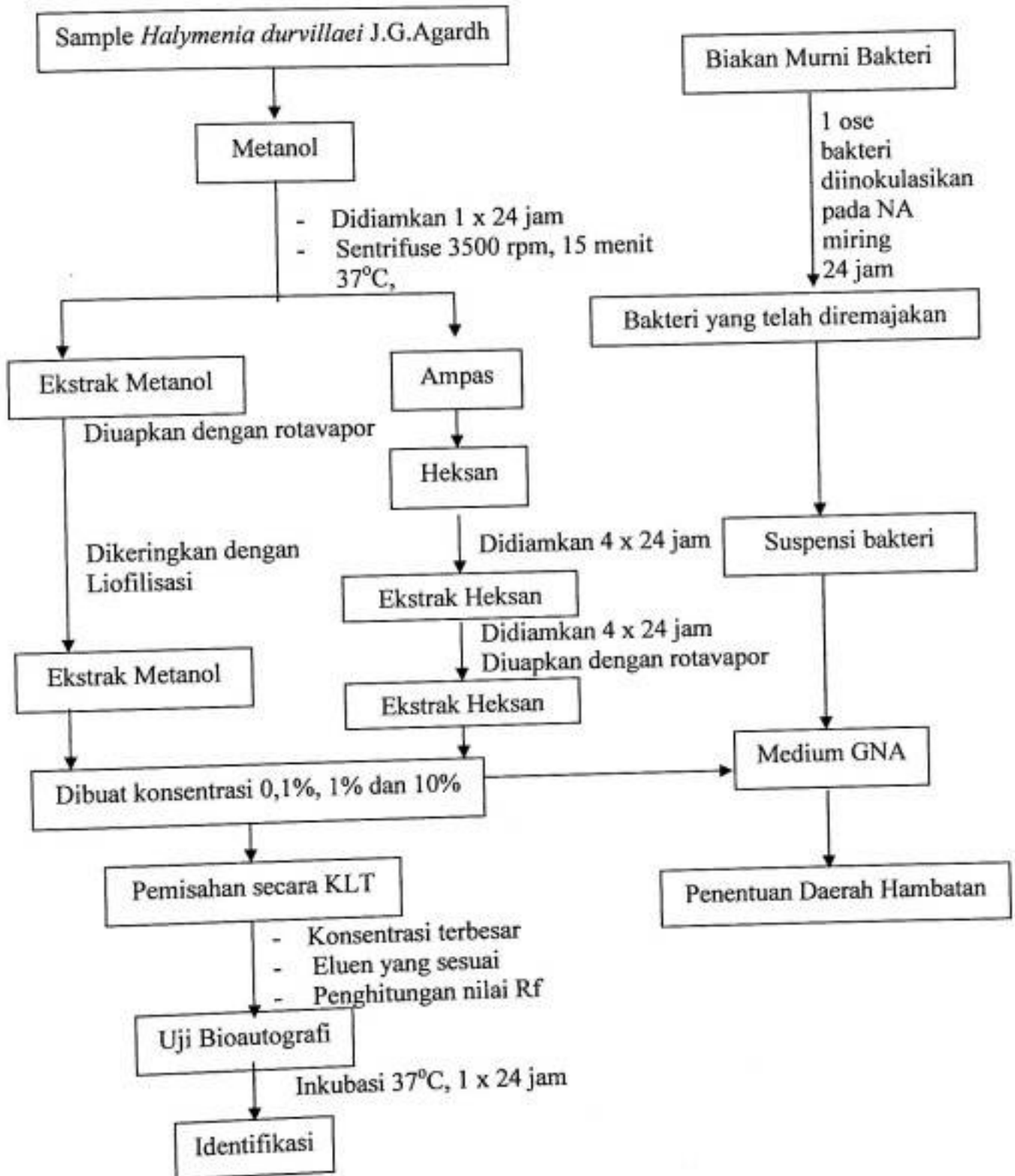
Ekstrak daging	: 3 gram
Pepton	: 5 gram
Agar	: 15 gram
Aquades steril	: 1000 ml

2. Medium Glukosa Nutrien Agar (GNA)

Komposisi

Glukosa	: 10 gram
Ekstrak khamir	: 5 gram
Pepton	: 5 gram
NaCl	: 2,5 gram
Agar	: 15 gram
Aquades steril	: 1000 ml

SKEMA KERJA



#### Lampiran 4

Hasil pengukuran diameter hambatan ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh dengan menggunakan penyari methanol terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*, *Basillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* masa inkubasi 1 x 24 jam

Jenis bakteri	Replikasi	Diameter (mm)			
		0,1 %	1 %	10 %	Kontrol (-)
<i>Escherichia coli</i>	1	6,55	7,80	9,80	0
	2	7,00	8,05	9,90	0
	$\Sigma X$	13,55	15,85	19,7	0
	X	6,78	7,93	9,85	0
<i>Basillus subtilis</i>	1	7,05	8,50	8,95	0
	2	6,85	8,60	9,10	0
	$\Sigma X$	13,9	17,1	18,05	0
	X	6,95	8,55	9,03	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	7,20	8,40	10,70	0
	2	7,95	8,65	11,45	0
	$\Sigma X$	15,15	17,05	22,15	0
	X	7,58	8,53	11,08	0

Hasil pengukuran diameter hambatan ekstrak *Halymenia durvillaei* J.G. Agardh dengan menggunakan penyari heksan terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*, *Basillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* masa inkubasi 1 x 24 jam

Jenis bakteri	Replikasi	Diameter (mm)			
		0,1 %	1 %	10 %	Kontrol (-)
<i>Escherichia coli</i>	1	6,00	6,95	8,40	0
	2	6,10	6,70	8,05	0
	$\Sigma X$	12,10	13,65	16,45	0
	X	6,05	6,83	8,23	0
<i>Basillus subtilis</i>	1	6,65	6,75	7,15	0
	2	6,75	6,95	7,05	0
	$\Sigma X$	13,4	13,7	14,2	0
	X	6,7	6,85	7,1	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	6,95	7,80	7,90	0
	2	6,55	7,30	8,30	0
	$\Sigma X$	13,5	15,1	16,2	0
	X	6,75	7,55	8,1	0